

THESIS

MÜNICH

1966

DAS VERHALTEN DES
SERUMINSULINSPIEGELS NACH
GLUCOSE-BELASTUNG BEI WÖCHNERINNEN
IN ABHÄNGIGKEIT VOM
GEWICHT DER NEUGEBORENEN

Dietmar Ennemoser

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. W. SEITZ

UND AUS DER II. FRAUENKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. R. FIKENTSCHER

DAS VERHALTEN DES SERUMINSULINSPIEGELS
NACH GLUCOSE-BELASTUNG BEI WÖCHNERINNEN
IN ABHÄNGIGKEIT VOM GEWICHT DER NEUGEBORENE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dietmar Ennemoser
aus Nürnberg

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Priv.-Dozent Dr. Hellmut MEHNERT
Correferent: Prof. Dr. Walter SEITZ
Dekan: Prof. Dr. Rudolf ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 5.7.1966

INHALTSVERZEICHNIS

- I. Einleitung
- II. Patientengut und Methodik
 - A. Patientengut und Durchführung der Blutentnahme
 - B. Prinzip der Insulinbestimmung
 - C. Chemische und biochemische Untersuchungsmethoden
 - 1) Enzymatische Glucosebestimmung
 - 2) Fettgewebismethode
 - 3) Diaphragmamethode
- III. Ergebnisse
- IV. Diskussion
 - 1) Besprechung des vorliegenden Schrifttums
 - 2) Diskussion der eigenen Ergebnisse
- V. Zusammenfassung
- VI. Literaturverzeichnis

I. EINLEITUNG:

In den letzten Jahren durchgeführte Forschungsarbeiten auf dem Gebiet des Diabetes haben sich in besonderem Maße mit den vielfältigen Problemen beschäftigt, die im Zusammenhang mit den durch die Schwangerschaft bedingten Stoffwechselstörungen stehen (CONSTAM, MESTWERDT, WORM, DITSCHUNEIT, MEHNERT). Von verschiedenen Autoren wurden Untersuchungsergebnisse vorgelegt, bei denen die Resultate nichtschwangerer und schwangerer Frauen - mit und ohne Diabetes - verglichen wurden. Besonders wichtig waren in diesem Zusammenhang Untersuchungen, die sich mit der durch moderne Methoden möglich gewordenen Messung der insulinähnlichen Aktivität im Serum beschäftigten. Es fällt auf, daß die in verschiedenen Laboratorien gewonnenen Werte einmal in Abhängigkeit von der verwendeten Methodik und zum anderen sogar auch unabhängig hiervon eine erhebliche Streubreite der Resultate aufwiesen. Insbesondere bestehen im Hinblick auf den Anteil des sogenannten freien und gebundenen Insulins im Serum erhebliche Differenzen. Man ist sich zwar darüber im klaren, daß entgegen früheren Vorstellungen prädiabetische, latent diabetische und die meisten manifest diabetischen Personen hohe Seruminsulinspiegel aufweisen, die vor allem durch den großen Anteil des gebundenen Insulins bedingt sind. Andererseits ist die Definierung des freien und gebundenen Insulins aber insofern noch sehr unklar, als vergleichende Untersuchungen, die mit verschiedener Methodik durchgeführt wurden, praktisch fehlen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit soll es deswegen sein, in zweierlei Hinsicht zur Lösung bestimmter Probleme beizutragen. Einmal sollen eigene Untersuchungen sich mit den Seruminsulinwerten und dem Glucosestoffwechsel von solchen Frauen beschäftigen, bei denen eine Entbindung wenige Tage vorher stattgefunden hatte. Zum anderen sollten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen einen Vergleich ermöglichen zwischen den am Zwerchfell und am Nebenhodentestgewebe der Ratte durchgeführten Insulintests. Insbesondere sollte dabei festgestellt werden, welche Methode - Diaphragma- oder Fettgewebsmethode mit Verwendung von Insulinantikörpern - sich zum Nachweis des sogenannten freien Insulins besonders eignet. Bei den bisherigen Untersuchungen war ein größeres Kollektiv von Wöchnerinnen nicht berücksichtigt worden. Von den Insulinwerten sollten nur solche Berücksichtigung finden, die von Wöchnerinnen mit einer normalen Glucosebelastungsprobe stammten. Mit anderen Worten waren also latent und manifest diabetische Frauen für die Auswertung der Befunde auszuschließen. Hingegen sollte versucht werden, eine Korrelation zwischen dem prädiabetischen Symptom eines hohen Geburtsgewichts der Kinder einerseits und den bei Prädiabetikern häufig vorkommenden hohen Seruminsulinwerten andererseits zu finden. Aus diesem Grunde sollten die Seruminsulinwerte zweier Gruppen von Wöchnerinnen verglichen werden, die sich durch das Gewicht der wenige Tage vorher geborenen Kinder (unter bzw. über 4000 g) unterscheiden.

II. PATIENTENGUT UND METHODIK

A. PATIENTENGUT UND DURCHFÜHRUNG DER BLUTENTNAHME:

Das Patientengut stammte aus der II. Universitäts-Frauenklinik München (Direktor Prof. Dr. R. Fikentscher). Die Auswahl der Frauen erfolgte ausschließlich im Hinblick auf das Geburtsgewicht ihrer kurz zuvor geborenen Kinder, wobei 4000 g als Grenzwert zwischen den beiden Gruppen angesehen wurde. Die Anamnese wurde dabei unberücksichtigt gelassen, ebenso das Geburtsgewicht der früher geborenen Kinder. Insgesamt standen 44 Patientinnen zur Verfügung; davon konnten aber die Ergebnisse von elf Frauen nicht ausgewertet werden, da bei ihnen die Werte für das gebundene Insulin höher waren als für das gesamte Insulin. Von sechs Patientinnen standen uns nur zwei Serumproben zur Verfügung (0' und 60'), die wir als Vorversuche benützten. Drei Patientinnen fielen aus, da sie nachträglich die Blutentnahme verweigerten bzw. nach der Glucosegabe erbrachen. Eine Patientin wurde wegen fehlender Unterlagen nur für die Gesamtauswertung (siehe Abb. 1) herangezogen. Somit blieben uns 23 Patientinnen, die wir in folgende Gruppen aufteilten:

11 Pat., Geburtsgewicht der Kinder weniger als 4000 g = Gruppe 1

12 Pat., Geburtsgewicht der Kinder mehr als 4000 g = Gruppe 2

Die Glucosebelastung wurde bei allen Patientinnen am 3. - 6. Tag post partum durchgeführt. Es handelte sich um eine Einfachbelastung, wobei die Patientinnen 100 g Glucose in Tee gelöst zu trinken bekamen. Dabei wurden jeweils 10 ccm Blut entnommen und zwar

- a) unmittelbar vor der oralen Glucosebelastung,
- b) 60 Min. nach der oralen Glucosebelastung,
- c) 120 Min. nach der oralen Glucosebelastung.

Diese Blutproben ließen wir zunächst 30 Minuten stehen und gewannen das Serum daraus durch 5-minütiges Abzentrifugieren bei 3000 U/Min. Dieses Serum wurde dann tiefgekühlt bei -15°C aufbewahrt bis zum Versuchstag, an dem es langsam bei Zimmertemperatur aufgetaut wurde.

B. PRINZIP DER INSULINBESTIMMUNG:

Zur Bestimmung der Insulinkonzentration im Serum wurde die Methode nach FROESCH und Mitarbeitern verwandt (30). Diesem Nachweis liegt folgendes Prinzip zugrunde:

Im Nebenhodenfettgewebe der juvenilen Ratte, das sich durch einen besonders lebhaften Stoffwechsel auszeichnet, wird Glucose zu H_2O und CO_2 abgebaut. Diese Reaktion ermöglicht einen quantitativen Nachweis von Insulin, da besonders in diesem Gewebe die Rate der Glucoseoxydation von der anwesenden Insulinmenge abhängig ist. Als Meßgröße dient der Nettogasaustausch des mit Glucose und Serum inkubierten Fettgewebes. Es besteht eine Proportionalität zwischen dem Logarithmus der Insulinkonzentration und der entwickelten Gasmenge. Einschränkend muß gesagt werden, daß auch andere Substanzen die Glucoseoxydation am Fettgewebe unspezifisch beeinflussen können (Aktivierung oder Hemmung); daher spricht man vereinbarungsgemäß im Hinblick auf die gewonnenen Meßergebnisse nicht von Insulinaktivität, sondern von insulinähnlicher Aktivität (insulin like activity = ILA). Bei diesem Verfahren wird die gesamte im untersuchten Patientenserum enthaltene ILA am Fettgewebe wirksam (sog. freie, unterdrückbare ILA bzw. gebundene, nicht unterdrückbare ILA).

Um zwischen unterdrückbarer ILA und nicht unterdrückbarer ILA zu unterscheiden, d.h. den Anteil von freiem und gebundenem Insulin zu bestimmen, wird die ILA jedes Serums auch nach Zusatz eines spezifischen Antiserums gemessen. Hierbei kommt der Anteil an freiem, durch die Antikörper unterdrückten Insulins, nicht zur Entfaltung der biologischen Aktivität. Die Differenz beider Bestimmungen entspricht dem Anteil an gebundenem Insulin.

In den unten beschriebenen Versuchen kam ein aus immunisierten Meerschweinchen gewonnenes Antiserum zur Anwendung. Der Titer des Antiserums wurde mit Lösungen von kristallinem Insulin bestimmt; die zur vollständigen Unterdrückung der freien ILA notwendige Menge bewegte sich im allgemeinen zwischen 0,06 - 0,08 ml pro Reaktionsansatz. Als weitere Möglichkeit zur Bestimmung der freien ILA kommt auch die Bestimmung der Glucoseaufnahme des Rattenzwerchfells in Betracht. Das gebundene Insulin soll an Muskelgewebe nicht wirksam sein. Die in der Zeiteinheit aufgenommene Glucosemenge ist dem Logarithmus der vorhandenen Insulinkonzentration proportional.

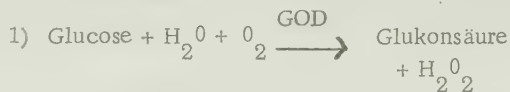
1) Enzymatische Glucosebestimmung:

Die in der Klinik häufig verwendeten Methoden der Blutzuckerbestimmung beruhen auf der reduzierenden Eigenschaft der Zucker und sind daher mehr oder minder unspezifisch für die Glucose; denn auch andere reduzierende Stoffe, wie Fructose, Galaktose, Pentosen, werden bei dieser Methode miterfaßt. Man erhält also höhere Blutzuckerwerte, als dem wahren Glucosegehalt entspricht.

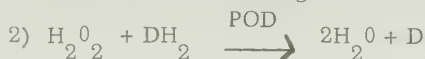
Die enzymatische Methode der Fa. C.F. BOEHRINGER & Söhne, Mannheim, scheint der Forderung nach Spezifität und leichter Durchführung zu genügen. Die Normalwerte betragen 46 bis 94 mg % (Durchschnitt 70 mg %) und liegen im Mittel 20 bis 25 mg % unter den unspezifischen Werten der anderen Methoden.

Das Prinzip der Reaktion ist folgendes:

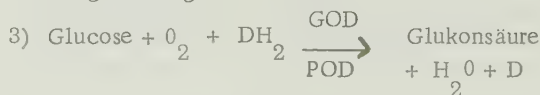
Das Enzym Glucoseoxydase (GOD) katalysiert die Oxydation von β -D-Glucose zum Glukonlakton, das weiter mit Wasser zu Glukonsäure reagiert:



Das dabei entstehende H_2O_2 wird in gekoppelter Indikatorreaktion weiter umgesetzt. H_2O_2 oxydiert unter enzymatischer Katalyse durch Peroxydase (POD) den Wasserstoffdonator " DH_2 " (z.B. o-Dianisidin) der dabei in den rotbraunen Farbstoff "D" übergeht:



Die Gesamtgleichung lautet dann



Die Menge des braunen Farbstoffes D ist also ein Maß für die umgesetzte Glucosemenge. Da die Reaktionen quantitativ ablaufen und GOD spezifisch auf D-Glucose eingestellt ist, wird also nur die "wahre Glucose" gemessen. Der Farbstoff wird bei einer Wellenlänge von 436 m μ kolorimetrisch bestimmt.

Notwendige Reagenzien:

1. Natriumdihydrogenphosphat NaH_2PO_4
2. Dinatriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4
3. Glucose - Oxydase GOD
4. Peroxydase POD
5. o - Dianisidinhydrochlorid
6. D - Glucose, DAB 6

Diese Reagenzien sind enthalten in der Biochemica TEST COMBINATION.

Herstellung der Lösungen:

1. Puffer - Enzym - Gemisch
 0,12 mol Phosphatpuffer, pH = 7,0
 40 μg Peroxydase / ml
 250 μg Glucoseoxydase / ml
 ad 150 ml aqua bidestillata
2. Chromogen
 6,6 mg o - Dianisidinhydrochlorid / ml
 ad 2,0 ml aqua bidestillata
3. Glucosestandardlösung
 91 μg Glucose / ml
4. 3,6%ige Perchlorsäure zum Enteiweißen

Die Substanzen 1 und 2 werden im Verhältnis 100 : 1 gemischt und ergeben das Glucosereagenz.

Durchführung:

- a. Die dem zu untersuchenden Inkubationsmedium entnommene Probe von 0,1 ml wird mit 3,6%iger Perchlorsäure enteiweißt und 5 Minuten bei 3000 U/Min. zentrifugiert.

b. Bestimmungsansatz	
Reagenzienleerwert	5,0 ml Glucosereagenz
	0,2 ml aqua bidest.
Glucosestandardwert	5,0 ml Glucosereagenz
	0,2 ml Glucosestandardlösung
zu untersuchende Proben	5,0 ml Glucosereagenz
	0,2 ml enteweißter Lösungsüberstand

Die Ansätze bleiben 35 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Nach dieser Zeit wird die Extinktion aller Proben, sowie die des Glucosestandardwertes, gegen die Extinktion des Reagenzienleerwertes bei einer Wellenlänge von 436 mμ in 1 cm Küvetten abgelesen.

Berechnung:

Um den Glucosegehalt pro ml Blut zu erhalten, bezieht man die Messung auf die Extinktion der Glucosestandardlösung. Der Glucosestandardwert enthält 18,2 μg Glucose pro Reaktionsansatz, was 1 mg / ml Blut entspricht, es ist also

$$\frac{\Delta E}{\text{Standard}} = \text{mg / ml Blut} \quad \text{oder}$$

$$\frac{\Delta E \text{ Probe}}{\Delta E \text{ Standard}} \times 100 = \text{mg \% Glucose}$$

Spezifität und Fehlerbreite:

Dieser Test ist spezifisch auf D-Glucose. Andere Zucker (z.B. Fructose, Lactose, Galaktose, Pentosen) werden nicht erfaßt. Lediglich Mannose ergibt eine positive, aber erheblich schwächere Reaktion als Glucose; jedoch sind keine pathologischen Bedingungen bekannt, bei denen Mannose im Blut vorkommt. Reduzierende Substanzen wie Kreatinin, Glucuronsäure und Harnsäure stören nicht. Dagegen können hohe Glutathion-Konzentrationen und extrem hohe Dosen von Vitamin C zu niedere Werte vortäuschen. Die durchschnittliche Fehlerbreite dieser Methode liegt unter $\pm 5\%$.

2) Fettgewebsmethode:

150 - 180 g schwere Sprague-Dawley-Ratten wurden ad libitum mit Altronin-Spezialkost gefüttert und zwölf Stunden vor Versuchsbeginn auf Hunger gesetzt. Durch Schlag auf den Kopf wurden die Ratten getötet, decapitiert und entblutet. Das Abdomen wurde breit eröffnet, um guten Zugang zum epididymalen Fettge-

webe zu haben. Mit einer Schere wurde von jeder Seite das Fettgewebe herausgeschnitten, und zwar entlang der Gefäße derart, daß der Nebenhoden auf keinen Fall verletzt wurde. Diese Fettgewebszipfel wurden nun von cranial nach caudal in sechs etwa gleich große Stücke geteilt und auf folgende Weise in die bereitstehenden Inkubationsgefäße verteilt: In jedes Gefäß kamen sechs Stücke, die von sechs verschiedenen Ratten stammten. Außerdem wurde die Verteilung der Gewebstücke so vorgenommen, daß die in einem Trog enthaltenen sechs Sechstel sich aus sechs verschiedenen Abschnitten von sechs verschiedenen epididymalen Fettanhängen zusammensetzten. Dadurch wurde ein gutes biologisches Mittel erreicht über verschiedene Ratten und über die cranialen, medialen und caudalen Abschnitte des Fettgewebes, die ja eine unterschiedliche Aktivität besitzen können. Mit dem Gewebe wurde dabei so sorgfältig wie möglich verfahren, um Gewebsquetschungen zu vermeiden. Für einen Versuchsansatz wurden sechs Ratten benötigt. Da man den rechten und den linken epididymalen Fettanhang im Hinblick auf seine biologische Aktivität gleichsetzt, konnten somit zwölf Einzelversuche durchgeführt werden. Die Inkubationsgefäße wurden vor und nach Zugabe des Fettgewebes gewogen; dabei wurde versucht, eine durchschnittliche Einwaage von 150 mg einzuhalten. Als Inkubationslösung diente Krebs-Ringer-Puffer, der am pH-Meter auf einen Wert von 7,3 eingestellt wurde.

Die Zusammensetzung der Krebs-Ringer-Lösung:

NaCl	8,26 g	=	141,000 mMol Endkonz.
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	335,90 mg	=	2,284 mMol "
KCl	422,00 mg	=	5,660 mMol "
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	350,00 mg	=	1,420 mMol "
KH_2PO_4	193,50 mg	=	1,420 mMol "
ad 1000 ml aqua bidestillata			

Natriumbicarbonatlösung:

NaHCO_3	2,875 g	=	34,200 mMol Endkonz.
ad 200 ml aqua bidestillata			

Herstellung des gebrauchsfertigen Puffers:

54,5 ml Krebs-Ringer-Lösung und 9,5 ml Natriumbicarbonatlösung, die vorher fünf Minuten lang mit reinem CO_2 begast wurde, werden gemischt. Diese Lösung wurde 10 Minuten lang mit Carbogen (95% O_2 und 5% CO_2) begast. Der so hergestellte Puffer wurde dann auf einen pH-Wert von 7,3 gebracht, indem überschüssiges CO_2 durch Schütteln langsam ausgetrieben wurde. Außerdem wurde diesem Puffer soviel Glucose zugesetzt, daß die Endkonzentration 200 mg% betrug.

Inkubationsansatz:

In jedes Reaktionsgefäß wurden 1,6 ml Puffer und 0,4 ml zu untersuchendes Serum pipettiert. Somit wurde eine Serumverdünnung von 1:5 erzielt, die von vielen Autoren als optimale Verdünnung angesehen wird. Die beschickten Gefäße wurden, um ein Abweichen von CO_2 zu verhindern, verschlossen und anschließend gewogen. Die inzwischen präparierten Fettgewebstücke wurden dann in der oben beschriebenen Weise auf die einzelnen Gefäße verteilt und durch nochmaliges Wiegen der Gefäße die Fettgewebsmenge bestimmt. Die Tröge wurden an Warburg'sche Doppelkapillarmanometer angeschlossen um Temperatenausgleich zu erzielen und fünf Minuten lang im Wasserbad des Warburg-Apparates äquilibriert. Währenddessen wurde durch ein zwei Minuten langes Begasen die Luft im Gasraum der Gefäße durch Carbogen verdrängt. Dann wurden die Manometerschenkel auf die Fixpunkte eingestellt und die Hähne vorsichtig geschlossen.

Die Inkubation dauerte 150 Minuten bei einer Temperatur von 37,5 Grad Celsius und einer Schüttelfrequenz von 96 pro Minute. Die Druckdifferenz zwischen den beiden Manometerschenkeln wurde alle 15 - 30 Minuten abgelesen. Der nach 150 Minuten erreichte Höhenunterschied bildete die Berechnungsgrundlage.

Eichung der Methode:

Da es sich um eine biologische Bestimmungsmethode handelt, ist es notwendig, die biologische Aktivität der für eine Versuchsserie verwendeten Fettgewebemischung (sechs Ratten) durch Standardinsulinwerte festzulegen. Um diese Eichung zu erhalten wurden jeweils vier Standardansätze gemessen, die an Stelle von Serum kristallines Insulin enthielten. Hierfür wurden jeweils Doppelbestimmungen mit 100 bzw. 1000 μE / ml des Ansatzes durchgeführt.

Die Herstellung dieser Insulinlösung geschah auf folgende Weise:

9,1 mg Rinderinsulin (10 mal umkristallisiert, glukagonfrei, 0,39% Zinkgehalt) werden in 10 ml n/10 HCl gelöst. 1 ml dieser Lösung enthält 20 IE Insulin. Diese Standardlösung wird bei $0-2^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und ist längere Zeit haltbar.

Lösung a: 0,1 ml Standardlösung wurden ad 100 ml mit aqua bidest. verdünnt. 100 ml Lösung a enthalten 2 IE Insulin. Diese Lösung ist in der Kälte ca. fünf Tage haltbar.

Durch Verdünnung mit Inkubationsmedium wurden die weiteren Insulinverdünnungen (Eichwerte) an jedem Versuchstag neu hergestellt. Als Reaktionsgefäße wurden geeichte Warburgtröge mit Kamin verwendet, die ein durchschnittliches Volumen von 15 ml hatten. Als Manometer wurden U-förmige Manometer der Fa. GILSON-ELEKTRONICA und Doppelkapillarmanometer der Fa. BRAUN benutzt.

Berechnung:

Grundlage der manometrischen Meßmethode ist die genaue Ermittlung des Systemvolumens, das die Ausgangsgröße für die zur Auswertung der manometrischen Ablesung unerläßliche Bestimmung der Gefäßkonstanten ist. Nach Maßangabe des Volumens der leeren Reaktionsgefäße und des Volumens der Kapillaren des angeschlossenen Manometers bis zur festgelegten Marke (15,0 bzw. 20,0 je nach Manometer), ergibt sich die Gefäßkonstante für jedes der zu benutzenden Reaktionssysteme aus folgender Formel:

$$K = \frac{V_G \cdot \frac{273}{T} + V_F \cdot \alpha}{P_o}$$

V_G = Volumen des Gasraumes im Versuchsgefäß einschließlich der Manometerkapillare.

$V_{\text{Warburgtrog}} + V_{\text{Manometer}} + 0,10 - V_F$

T = absolute Versuchstemperatur (310,5° Kelvin)

V_F = Volumen des eingefüllten Inkubationsmediums (in diesem Fall 2 ml)

α = Bunsen'scher Absorptionskoeffizient des entstandenen Gases (bei CO_2 = 0,665 bei 37° C)

P_o = 760 mm Hg umgerechnet auf Manometerflüssigkeit (bei BRODIE - Lösung $P_o = 10$)

Ist die Gefäßkonstante für die einzelnen Reaktionsgefäße errechnet worden, so ergibt sich die Menge des von 1 mg Gewebe pro Stunde entwickelten Gases (x) aus folgender Formel:

$$x = \frac{h \cdot K}{\text{Gewicht} \cdot \text{Stunden}}$$

h = Höhenunterschied der beiden Manometerschenkel bei Versuchsende in mm.

3. Diaphragmamethode:

Vorbereitung der Inkubationslösung und Zusammensetzung der Krebs-Ringer-Lösung erfolgte wie für die Fettgewebsmethode beschrieben.

Die Ratten wurden durch Schlag auf den Kopf getötet, decapitiert und entblutet. Durch zwei medio-lateral-Schnitte wird das Abdomen vom Unterbauch bis zu den Rippenbogen breit geöffnet und von der Bauchhöhle her das Zwerchfell herauspräpariert. Um besseren Zugang zum Diaphragma zu haben, wird die Leber entfernt. Entlang der sehnigen Verbindung zwischen Muskel und Brustwand wird das Zwerchfell durchtrennt. Danach wird das gelöste Diaphragma herausgenommen und anhaftendes Blut entfernt. Das Centrum tendineum wird abpräpariert und die Muskelplatte in zwei etwa gleichgroße Teile geteilt. Die so dargestellten Hemidiaphragmen werden in glucosefreie Inkubationslösung gebracht und 15 Minuten in eiskühler Inkubationslösung aufbewahrt. Sie werden dann sorgfältig mit Filterpapier getrocknet und in die vorbereiteten Inkubationsansätze gebracht. Bei dieser Methode verwendet man eine Ausgangskonzentration von 300 mg% Glucose. Die Glucosekonzentration eines jeden Inkubationsansatzes wird vor und nach der Inkubation mit Diaphragma auf enzymatischem Wege bestimmt. Die Inkubationsdauer im Warburg'schen Inkubationsgerät betrug 150 Minuten bei $37,5^{\circ}\text{C}$ und einer Schüttelfrequenz von 96/Min. Die Diaphragmen wurden nach beendeter Inkubation herausgenommen, auf Filterpapier abgetupft und auf vorgewogenen Uhrglaschen bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Danach wurden sie auf der Analysenwaage mit einer Genauigkeit von 0,01 mg gewogen.

Die Glucoseaufnahme wird in mg Glucose / mg Zwerchfell ausgedrückt.

Die Eichung des Verfahrens erfolgte wie bei der Fettgewebsmethode unter Verwendung von Insulinlösungen bekannter Konzentration (50 und 500 $\mu\text{E/ml}$ als Standardwerte).

III. ERGEBNISSE:

Die Ergebnisse werden im folgenden in Form von Tabellen und Abbildungen wiedergegeben.

TAB. 1: Werte der Blutglucose (in mg%) und des Seruminsulins (in $\mu\text{E}/\text{ml}$) der Gruppe 1

Zeit		0'	60'	120'
1 T.M., 22 J., Kind 3320 g	mg% Gluc.	44	121	78
	Fr. Ins. F. ⁺	45	492 ¹⁾	91
	geb. Ins.	29	208	64
	ges. Ins.	74	700 ¹⁾	155
	Fr. I.D.	23	360	70
2 B.J., 28 J., Kind 2850 g	mg% Gluc.	50	101	77
	Fr. Ins. F.	24	9	24
	geb. Ins.	62	136	91
	ges. Ins.	86	145	115
	Fr. I.D.	30	13	45
3 F.E., 24 J., Kind 3780 g	mg% Gluc.	43	99	53
	Fr. Ins. F.	0	100	160
	geb. Ins.	390	245	210
	ges. Ins.	390	345	370
	Fr. Ins. D.	55	100	550

⁺ fr. Ins. F. = freies Insulin bestimmt am Fettgewebe
 geb. Ins. = gebundenes Insulin bestimmt am Fettgewebe
 ges. Ins. = Gesamtinsulin
 fr. Ins. D. = freies Insulin bestimmt am Diaphragma

1) Diese beiden Werte sind mathematisch gesehen nicht vorhanden, sie wurden deshalb für die Abb. 2 nicht berücksichtigt.

	Zeit	0'	60'	120'
4 G.H., 30 J., Kind 3380 g	mg%	33	140	107
	Fr. Ins. F.	34	13	15
	geb. Ins.	49	55	78
	ges. Ins.	83	68	93
	Fr. Ins. D.	440	172	70
5 B.J., 38 J., Kind 2800 g	mg% Gluc.	36	124	80
	Fr. Ins. F.	58	45	45
	geb. Ins.	72	100	95
	ges. Ins.	130	145	140
	Fr. Ins. D.	87	150	1000
6 F.J., 33 J., Kind 2540 g	mg% Gluc.	56	111	95
	Fr. Ins. F.	44	15	23
	geb. Ins.	66	115	160
	ges. Ins.	110	130	183
	Fr. Ins. D.	190	100	120
7 Sch.B., 33 J., Kind 3100 g	mg% Gluc.	53	112	104
	Fr. Ins. F.	16	150	30
	geb. Ins.	74	99	80
	ges. Ins.	90	249	110
	Fr. Ins. D.	28	162	50

Zeit		0 ^s	60'	120'
8 St.H., 35 J., Kind 3230 g	mg% Gluc.	40	129	94
	Fr. Ins. G.	19	56	14
	geb. Ins.	9	16	38
	ges. Ins.	28	72	52
	Fr. Ins. D.	25	90	60
9 R.B., 31 J., Kind 3700 g	mg% Gluc.	40	121	127
	Fr. Ins. F.	6	20	105
	geb. Ins.	15	4	15
	ges. Ins.	21	24	120
	Fr. Ins. D.	170	65	60
10 H.H., 40 J., Kind 3950 g	mg% Gluc.	56	152	70
	Fr. Ins. F.	235	160	100
	geb. Ins.	65	120	148
	ges. Ins.	300	280	248
	Fr. Ins. D.	45	150	105
11 B.H., 32 J., Kind 3950 g	mg% Gluc.	48	124	76
	Fr. Ins. F.	9	10	45
	geb. Ins.	49	58	49
	ges. Ins.	58	68	94
	Fr. Ins. D.	400	300	102
12 Angaben fehlen, Er- gebnisse nur für Abb. 1 ausge- wertet. T. M.	mg% Gluc.	51	122	119
	Fr. Ins. F.	470	420	110
	geb. Ins.	170	260	220
	ges. Ins.	640	680	330
	Fr. Ins. D.	28	270	19

TAB. 2: Werte der Blutglucose (in mg%) und des Seruminsulins (in $\mu\text{E/ml}$) der Gruppe 2

Zeit		0'	60'	120'
1 R.H., 27 J., Kind 4250 g	mg% Gluc.	41	120	100
	Fr. Ins. F.	160	15	50
	geb. Ins.	55	255	170
	ges. Ins.	215	270	220
	Fr. Ins. D.	50	160	115
2 M.J., 32 J., Kind 4180 g	mg% Gluc.	38	76	33
	Fr. Ins. F.	35	14	20
	geb. Ins.	35	26	31
	ges. Ins.	70	40	51
	Fr. Ins. D.	55	108	60
3 H.F., 20 J., Kind 4170 g	mg% Gluc.	37	108	88
	Fr. Ins. F.	17	10	64
	geb. Ins.	65	140	56
	ges. Ins.	82	150	120
	Fr. Ins. D.	46	63	45
4 W.A., 38 J., Kind 4510 g	mg% Gluc.	48	110	92
	Fr. Ins. F.	16	130	166
	geb. Ins.	36	34	34
	ges. Ins.	52	164	200
	Fr. Ins. D.	94	270	105

	Zeit	0"	60"	120"
5 Sch.O., 26 J., Kind 4050 g	mg% Gluc.	38	82	56
	Fr. Ins. F.	50	150	310
	geb. Ins.	320	500	170
	ges. Ins.	370	650	480
	Fr. Ins. D.	80	1100	330

6 N.H., 34 J., Kind 4230 g	mg% Gluc.	51	99	90
	Fr. Ins. F.	0	326	170
	geb. Ins.	510	274	560
	ges. Ins.	510	600	730
	Fr. Ins. D.	40	560	198

7 B.H., 36 J., Kind 4460 g	mg% Gluc.	48	83	84
	Fr. Ins. F.	20	430	500
	geb. Ins.	330	350	250
	ges. Ins.	350	780	750
	Fr. Ins. D.	108	410	750

8 B.E., 33 J., Kind 4320 g	mg% Gluc.	51	126	115
	Fr. Ins. F.	20	27	18
	geb. Ins.	48	149	85
	ges. Ins.	68	176	103
	Fr. Ins. D.	350	1700	1090

	Zeit	0'	60'	120'
9 G.H., 27 J., Kind 4020 g	mg% Gluc.	39	107	108
	Fr. Ins. F.	80	55	470
	geb. Ins.	140	350	130
	ges. Ins.	220	405	600
	Fr. Ins. D.	120	155	100
10 B.L., 27 J., Kind 4400 g	mg% Gluc.	40	102	81
	Fr. Ins. F.	28	93	120
	geb. Ins.	25	37	80
	ges. Ins.	53	130	200
	Fr. Ins. D.	50	100	140
11 N.H., 31 J., Kind 4380 g	mg% Gluc.	51	110	113
	Fr. Ins. F.	165	120	270
	geb. Ins.	35	440	130
	ges. Ins.	200	560	400
	Fr. Ins. D.	300	170	28
12 W.A., 21 J., Kind 4350 g	mg% Gluc.	51	150	91
	Fr. Ins. F.	22	100	40
	geb. Ins.	66	210	280
	ges. Ins.	88	310	320
	Fr. Ins. D.	70	400	25

Verhalten der Seruminsulinwerte nach Glucosebelastung (100g per os)
bei 24 Wöchnerinnen.

Bestimmung des „Insulins“ am Fettgewebe und am Diaphragma.

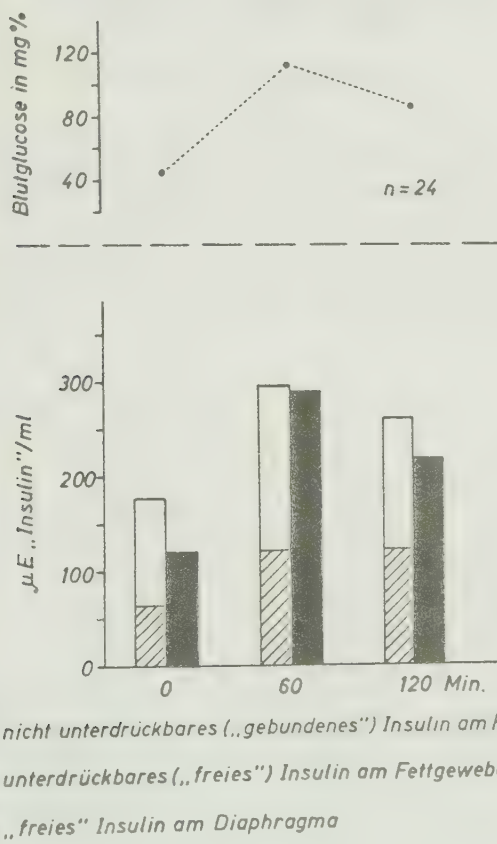


ABBILDUNG 1

Verhalten der Seruminsulinwerte nach Glucosebelastung (100g per os) bei
Wöchnerinnen in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht der Neugeborenen.
Bestimmung der insulinähnlichen Aktivität am Fettgewebe.

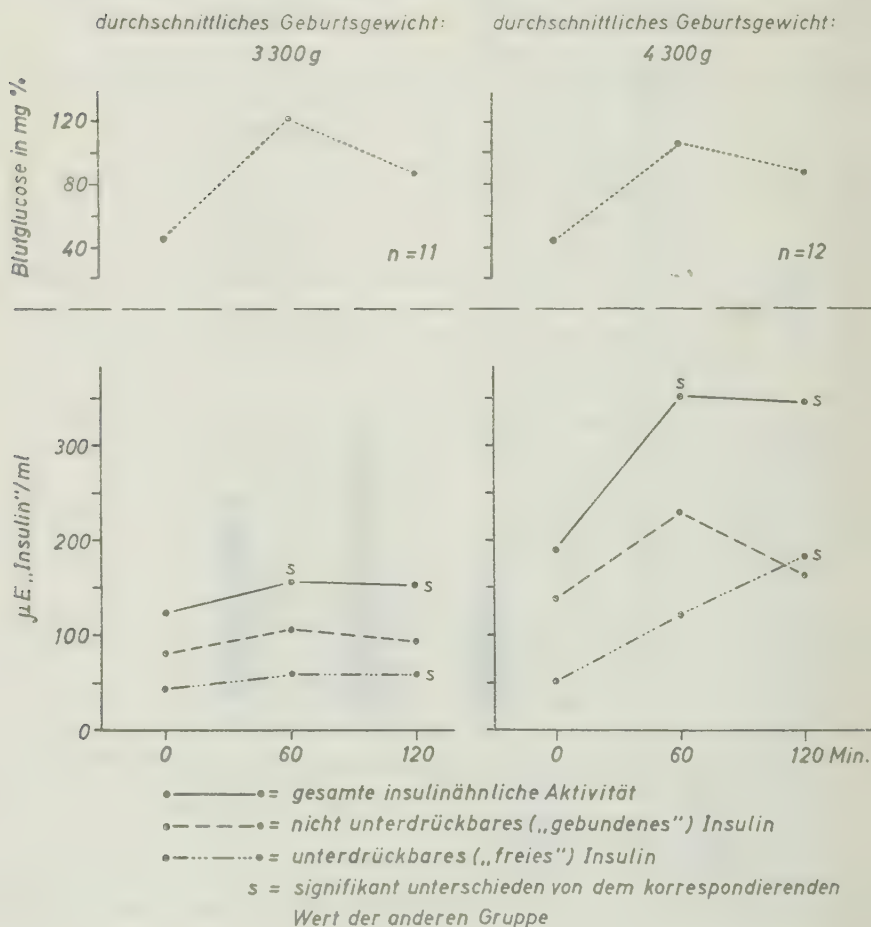


ABBILDUNG 2

*Signifikanz der Insulinwerte nach 60 und 120 Minuten
im Vergleich zum Ausgangswert bei Gruppe 2*

<i>Insulin</i>	<i>60 Min.</i>	<i>120 Min.</i>
<i>freies</i>	—	$p < 0,025$
<i>gebundenes</i>	—	—
<i>gesamtes</i>	$p < 0,005$	$p < 0,005$

*Signifikanz der Insulinwerte zwischen Gruppe 1 und
Gruppe 2*

<i>Insulin</i>	<i>0 Min.</i>	<i>60 Min.</i>	<i>120 Min.</i>
<i>freies</i>	—	—	$p < 0,04$
<i>gebundenes</i>	—	—	—
<i>gesamtes</i>	—	$p < 0,03$	$p < 0,025$

Mittelwerte zu den Abbildungen:

Abb. 1

	<i>0'</i>	<i>60'</i>	<i>120'</i>
mg% Gluc.	45	113	88
fr. Ins. F.	65	123	123
geb. Ins.	113	174	138
ges. Ins.	178	297	261
fr. Ins. D.	120	290	218

Abb. 2
unter 4000 g

mg% Gluc.	45	121	87
fr. Ins. F.	44	58	59
geb. Ins.	80	105	93
ges. Ins.	124	153	152

Abb. 2
über 4000 g

mg% Gluc.	44	106	88
fr. Ins. F.	51	122	183
geb. Ins.	138	230	164
ges. Ins.	189	352	347

IV. DISKUSSION:

1) Besprechung des vorliegenden Schrifttums

Zur quantitativen Bestimmung von Insulin im Blut wurden in den letzten Jahren verschiedene Methoden entwickelt. Sie beruhen im Prinzip alle auf dem Vergleich bestimmter biologischer Wirkungen von Serum oder Plasma mit den entsprechenden charakteristischen Wirkungen kristallinen Insulins. Ein direkter quantitativer Nachweis kleinster Insulinmengen auf chemischem oder physiko-chemischem Wege, der zur Bestimmung von Insulin in Körperflüssigkeiten dienen könnte, ist bis heute nicht bekannt.

Bei den biologischen Verfahren werden entweder der hypoglykämische Effekt am lebenden Versuchstier oder die direkte Wirkung, die das Insulin auf den Stoffwechsel isolierter Gewebe ausübt, zur quantitativen Insulinbestimmung benützt. Die blutzuckersenkende Wirkung am hungernden Kaninchen, die in der pharmazeutischen Industrie zur Standardisierung von Insulinlösungen allgemein verwandt wird, ist für eine Bestimmung der Insulinkonzentration im Blut zu unempfindlich. Die Bestimmungsmethoden, die auf Stoffwechseluntersuchungen isolierter Gewebe *in vitro* beruhen, sind relativ einfach durchzuführen. Im wesentlichen handelt es sich um folgende Methoden:

1. Bestimmung der Insulinwirkung auf die Glucoseaufnahme am Rattenzwerchfell (1-10, 14, 33).
2. Bestimmung der Glucoseaufnahme durch das isolierte, perfundierte Rattenherz sowie Bestimmung der Kohlendioxydbildung von Gewebsschnitten der laktierenden Brustdrüse der Ratte. Beide Methoden haben sich aber bisher für den quantitativen Insulinnachweis nicht durchgesetzt (11, 22).
3. Bestimmung der Glucoseaufnahme durch den epididymalen Fetthanhang der Ratte (13-19, 30, 33).
4. Bestimmung des Nottogasaustausches des epididymalen Fettgewebes der Ratte (14, 15, 18, 19, 20, 30).
5. Bestimmung kleinster Insulinmengen an deren Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel des isolierten Fettgewebes der Ratte unter Verwendung radioaktiv markierter Glucose (15, 19-29). Diese Methode wurde von MARTIN, DAGENAIS und RENOLD (19) beschrieben und baut auf den Arbeiten von HAUSBERGER (21, 31, 32), MILSTEIN (22), WINEGARD und RENOLD (20) auf. Sie beruht auf dem Erkenntnis, daß das Fettgewebe einen sehr lebhaften, intermediären Stoffwechsel besitzt, auf den Insulin direkt einzuwirken vermag. Experimentell ließ sich in Fettgewebe des lebenden Versuchstieres und auch *in vitro* die Synthese von Glykogen aus Glucose, die Oxydation von Glucose, Pyruvat und Acetat und auch der Aufbau langer Fettsäuremoleküle aus Glucose, Acetat und Propionat nachweisen.

Die direkte Insulinwirkung auf den Stoffwechsel im Fettgewebe beweisen die Störungen, die bei alloxandiabetischen Tieren auftreten und die durch Insulin vollkommen beseitigt werden können. In vitro läßt sich dieser direkte Effekt an der Steigerung der Glucoseaufnahme, der Fettsynthese und an dem Sauerstoffverbrauch aufzeigen.

Für die quantitative Insulinbestimmung mit dem epididymalen Fettgewebe der Ratte und radioaktiver Glucose erwies sich die Markierung des Traubenzuckers am 1. Kohlenstoffatom als besonders vorteilhaft, wenn der Insulineffekt an der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung gemessen werden soll. Mit unterschiedlich markierten Glucosemolekülen wurde nach Insulinzusatz ein besonders markanter Anstieg der Oxydation am C_1 -Atom gefunden. C_6 wurde dagegen im Gewebe vorwiegend zur Fettsynthese benutzt. Da C_6 und auch C_1 in gleichem Maße über den glykolytischen Abbauweg (EMBDEN-MEYERHOF) in Fettsäuren eingebaut werden, spricht dieser Befund für eine selektive Insulinwirkung auf die direkte Oxydation, z.B. über den DICKENS-HORECKER-Zyklus, eine Ansicht, die zuerst MILSTEIN (22) geäußert hat. Auf die Glykolyse übt Insulin wahrscheinlich keinen wesentlichen Einfluß aus. Auch die von ABRAHAM und Mitarbeitern (25, 27) erhobenen Befunde an Schnitten aus der laktierenden Brustdrüse der Ratten unterstützten diese Annahme.

Die Ergebnisse bei dieser Methode ergeben eine exponentielle Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus der Insulinkonzentration und der Quadratwurzel aus der gemessenen und auf mg Fettgewicht umgerechneten Impulszahl pro Minute. Die Kurve ergibt eine lineare Regression, die durch entsprechende Koordinatenteilung graphisch als Gerade dargestellt werden kann. Da aber nach den Ergebnissen von DITSCHUNEIT und PFEIFFER (23) die Abstände der einzelnen Kurven von der Abszisse signifikant voneinander verschieden sind, muß die Standardkurve zu jedem Versuch neu bestimmt werden. Allerdings bleibt der Anstieg dieser Kurven konstant, so daß die Bestimmung einer einzigen Insulinkonzentration genügen soll, um diese Kurve festzulegen. Da die Insulinbestimmung mit radioaktiver Glucose bis jetzt zu den genauesten Methoden gehört, sollen deren Ergebnisse kurz geschildert werden, um sie dann mit den eigenen Befunden vergleichen zu können. Dabei wurden die Arbeiten von DITSCHUNEIT und PFEIFFER (23), FROESCH (36), HUMBEL (13), WEINGES und WÖRNER (24) berücksichtigt.

DITSCHUNEIT und PFEIFFER (23) geben als Normalbereich bei gesunden Kontrollpersonen Insulinwerte von 130 - 680 μE pro ml an, und zwar als Nüchternwert. Die Fehlerbreite der Methode wird für die Einzelbestimmungen mit 60 bis 170% des gefundenen Wertes angegeben. Das Serum wurde ausschließlich 1:2 mit Puffer verdünnt; die Verdünnung des Serums führte in den meisten Fällen zu relativ höheren Insulinwerten. Die Ursache ist offenbar darin zu suchen, daß insulinhemmende Faktoren durch die Verdünnung eine schnellere Wirkungsminderung als das im Serum befindliche Insulin erfahren. HUMBEL (13) gibt als Insulinakti-

vität gesunder Kontrollpersonen Werte von 20 - 800 μE pro ml an, und zwar mit der Methode der Glucoseaufnahme des epididymalen Fettgewebes bestimmt. Verdünnung des Serums hat nach HUMBEL keinen Einfluß auf seine Insulinaktivität.

WEINGES und WÖRNER (24) geben eine Fehlerbreite zwischen 52 und 190% der quantitativen Werte an. Von 18 gesunden Kontrollpersonen wurden die Nüchterwerte ermittelt, und zwar lagen zwölf Werte zwischen 50 und 535 μE pro ml, sechs Fällen unter 50 μE pro ml. Bei Bestimmung der Glucoseaufnahme erhielten sie bei 16 Personen Nüchternwerte in zehn Fällen zwischen 50 und 910 μE pro ml, in sechs Fällen unter 50 μE pro ml. Die Autoren lehnen auch die Konstanz des Anstiegs der Standardkurven und deren Parallelität ab, sie fixierten die Eichkurven zu jedem Versuch neu und zwar aus mindestens zwei Punkten.

FROESCH (30) beschäftigte sich hauptsächlich mit der sogenannten unterdrückbaren und nicht unterdrückbaren Insulinaktivität. Die Bestimmung erfolgte mit den Methoden des Nettogasaustausches und der Glucoseaufnahme. Die Werte für die totale ILA reichen von 68 bis 587 μE pro ml im Serum von hungernden, gesunden Patienten. Der weitaus größte Anteil der totalen ILA war aber durch Antiinsulin nicht zu unterdrücken, d.h. das sog. freie Insulin erreichte nur Werte von 0 bis 93 μE pro ml. Insgesamt sind nur 7% zu unterdrücken: z.B. war der Mittelwert für die totale ILA 180, für das freie Insulin dagegen 13 μE pro ml. Demnach müßte für das gebundene Insulin ein Mittelwert von ca. 167 μE pro ml entstehen, was 93% der totalen ILA entspricht. In drei Fällen (von 22) war der Wert für die unterdrückbare ILA sogar größer als die totale ILA, so daß negative Werte für das freie Insulin entstanden. Nach Verabreichung von 100 g Glucose stieg das freie Insulin vom Mittelwert 13 auf 111 an, wogegen das gebundene Insulin keinen konsequenten Anstieg aufwies, die Werte erhöhten sich im Durchschnitt lediglich von 122 auf 131. Als unteren Grenzwert fand FROESCH 39 μE pro ml als Mittelwert aus 104 Seren, die alle 1:5 verdünnt waren. Aus diesen Versuchen und aus den Ergebnissen, die er von Diabetikern erhielt, kommt er zu der Annahme, daß die unterdrückbare ILA von der Höhe des Blutzuckers gesteuert wird. Unter Serumverdünnung fand er eine proportionale Verminderung der ILA, vorausgesetzt, daß die Werte des Nettogasaustausches mit der Zunahme der CO_2 -Aufnahme im verdünnten Serum in Beziehung gesetzt wurden.

VALLANCE-OWEN (4, 5) befaßte sich nur mit der Diaphragmamethode (1954). Er bestätigte die Ergebnisse von STADIE und ZAPP (9, 1947), KRAHL und PARK (10, 1948), daß zwischen der Menge an Insulin im Inkubationsmedium und dem Effekt auf den Glucosestoffwechsel des Diaphragmas eine quantitative Beziehung besteht.

GROEN (1-3) und andere Autoren stellten bereits 1952 mit einer so geringen Insulindosis wie 5 μE pro ml einen deutlichen Anstieg des Glucoseverbrauchs fest. Als Normalbereich fand VALLANCE-OWEN Werte zwischen 62,5 und 652 μE pro ml.

ml. Die Methodik war im wesentlichen so ausgeführt worden wie bei unseren Versuchen (siehe Teil II), allerdings betrug die Inkubationszeit nur 90 Min. Als optimales Diaphragmatrockengewicht fand er 20 bis 26 mg; die Glucoseaufnahme ist bei diesem Gewicht groß genug, um leicht gemessen werden zu können. Bei größeren Diaphragmen sind die Ergebnisse unregelmäßig, wahrscheinlich wegen schlechter Diffusionsverhältnisse. Die Versuchsergebnisse schwankten bei VALLANCE-OWEN um ca. 3,5% am selben Versuchstag und um 30% in Bezug auf die anderen Versuchstage. In der Diskussion gab der Autor erhebliche Differenzen zwischen ihm und GROEN (1-3), KRAHL (10) und anderen Autoren an. Im unverdünnten Serum fand er eine relativ höhere Glucoseaufnahme als im verdünnten Serum. Eine direkte Beziehung zwischen Blutzuckerniveau und Höhe des Insulinspiegels wurde auch von ihm festgestellt.

Entsprechend seinen Ergebnissen konnte VALLANCE-OWEN sein Patientengut in zwei Gruppen aufteilen; eine Gruppe mit Werten von 600-800 μ E Insulin pro ml und Blutzuckerwerten über denen der nüchternen Patienten, sowie eine zweite Gruppe mit Werten von 100 bis 300 μ E Insulin pro ml und Blutzuckerwerten wie bei den nüchternen Patienten und darunter. Es scheint, daß diese Gruppen den normalen Typen entsprechen, indem sie auf den Glucosetoleranztest langsam bzw. schnell reagieren. Verabreicht wurden 50 g Glucose per os; gemessen wurde nach einer Stunde. Die Fehlerbreite dieser Methode wird in der Literatur allgemein mit 30 bis 300% des gefundenen Wertes angegeben, wogegen sie bei der Fettgewebsmethode nur 60 bis 170% betragen soll.

2) Diskussion der eigenen Ergebnisse:

Die erste Fragestellung, die dieser Arbeit zugrunde lag, bezog sich auf die Beurteilung des Wertes verschiedener biologischer Methoden zur Bestimmung des Seruminsulins. Während an der Brauchbarkeit der Bestimmung des gesamten Insulins am Nebenhodenfettgewebe der Ratte auf Grund der von vielen Autoren in aller Welt durchgeführten Untersuchungen keine Zweifel bestehen, ist die Aussagekraft über den Wert der Methoden zur Differenzierung von freiem und gebundenem Insulin sehr umstritten. Theoretisch soll am Muskel, üblicherweise am Diaphragma der Ratte, nur das freie Insulin wirksam sein, während im Fettgewebe - wohl durch Faktoren, die das Insulin aus seinen Bindungen lösen - auch gebundenes Insulin zur Wirkung kommen soll. Der naheliegende Versuch, nun einfach aus der Differenz zwischen dem am Fettgewebe bestimmten Gesamtinsulin und dem am Diaphragma bestimmten freien Insulin den Anteil des gebundenen Insulins zu ermitteln, ist aber aus verschiedenen Gründen nicht statthaft. Der wohl wichtigste Grund zur Ablehnung eines solchen Verfahrens liegt in der Ungenauigkeit der Diaphragmamethode, wie von vielen Untersuchern betont und auch von uns

festgestellt wurde. Die Streubreite der Ergebnisse ist enorm, und häufig genug ergeben sich für den Einzelfall höhere Werte an freiem Insulin als an Gesamtinsulin. Sicherlich sind die Mittelwerte der Diaphragmamethode bei einem größeren Kollektiv niedriger als die Mittelwerte, die sich bei der Bestimmung des Gesamtinsulins mit Hilfe der Fettgewebismethode ergaben (vgl. Abb. 1). Dieser Unterschied ist aber so gering, daß man schon deswegen eine Relevanz der Ergebnisse bezweifeln muß. Abb. 1 ist zwar zu entnehmen, daß - wie man es ja erwarten sollte - nach Glucosebelastung die Differenz zwischen freiem, am Diaphragma bestimmten Insulin und Gesamtinsulin geringer wird. Dies ließe sich zwanglos mit der auf den Glucosereiz hin erfolgenden Ausschüttung von freiem Insulin aus der Bauchspeicheldrüse erklären. Andererseits aber ist aus Abb. 1 auch zu erkennen, daß das mit der Fettgewebismethode unter Verwendung von Antiserum indirekt bestimmte freie Insulin wesentlich geringere Werte aufweist als sie am Diaphragma festgestellt wurden. Das Verhalten nach dem Glucosereiz ist dabei übrigens ebenfalls so, daß die Ausschüttung erwartungsgemäß deutlich zunimmt. Es muß nun offenbleiben, welche Anteile der "insulin-ähnlichen Aktivität" (ILA) mit diesen beiden Methoden überhaupt bestimmt wurden. Ein genau definierbares "freies Insulin", das mit verschiedenen Methoden immer wieder in der gleichen Größenordnung vorgefunden wird, gibt es auf Grund unserer Ergebnisse und der Mitteilung anderer Autoren offenbar nicht. Es sei hinzugefügt, daß die mit der radio-immunologischen Methode ermittelten Werte anderer Autoren ebenfalls besonders niedrig im Vergleich zu den Diaphragmawerten beschrieben wurden. Wegen der von anderen Autoren und uns festgestellten Unzuverlässigkeit der Diaphragmamethode werden zur Beantwortung der zweiten Fragestellung dieser Arbeit nur die Ergebnisse der Fettgewebismethode herangezogen. Definitionsgemäß entspricht das am Fettgewebe bestimmte freie Insulin dann jenem Anteil der Gesamtaktivität, der durch Zusatz von Insulin-Antiserum unterdrückt werden kann. Ob die am Diaphragma gewonnenen höheren Werte darauf zurückzuführen sind, daß am Muskelgewebe ein größerer Anteil Insulin, als es dem mit Antiserum unterdrückbaren Insulin entspricht, noch wirksam wird, kann auf Grund unserer Untersuchungen nur vermutet, aber nicht bewiesen werden. Es soll im übrigen nicht verschwiegen werden, daß - wie es auch von anderen Autoren mitgeteilt wurde - auch die Methode zur Bestimmung von freiem und gebundenem Insulin am Fettgewebe ihre Schwierigkeiten und Fehlerquellen hat.

In einem bestimmten, von FROESCH (30) mit 14% angegebenen, und von uns mit 26% ermittelten Verhältnis, sind die Ergebnisse deswegen nicht verwertbar, weil sich bei der Bestimmung des gebundenen Insulins höhere Werte als bei der Bestimmung des Gesamtinsulins ergaben. Die naheliegende Erklärung für diesen Befund ist eine aus allerdings, unklaren Gründen bestehende Unwirksamkeit des Insulin-Antiserums, das trotz der vorangegangenen Titerbestimmung bei Untersuchung der einen oder anderen Serumprobe sich als unwirksam erwies. Daß dann

allerdings paradoxerweise das gebundene Insulin teilweise sogar höher war als das gesamte Insulin, ist nur mit der auch von anderen Autoren angegebenen Fehlerbreite der Fettgewebsmethode (60-170%) zu verstehen. Zu diskutieren ist auch, ob das Antiserum der mit Insulin immunisierten Tiere einen gewissen Anteil zunächst an Antikörper gebundenen Insulins enthält, das nur bei Verwendung bestimmter Seren am Fettgewebe, aus seinen Bindungen gelöst wird. Auch dann wären die höheren Werte des gebundenen Insulins erklärbar. Es muß aber betont werden, daß diese Hypothese durchaus nicht bewiesen ist.

Aus Abb. 2 ist das Ergebnis dieser Arbeit mit einem Blick zu ersehen: Bei praktisch gleichartigem und normalem Verlauf der Blutzuckerkurven zeigen die Wöchnerinnen, die Kinder mit hohem Gewicht geboren hatten, pathologisch erhöhte Werte der Gesamtaktivität des Insulins. Als Normalwerte werden von anderen Autoren 68 - 587 μE pro ml (bzw. 130 - 680, 20 - 800) angegeben, was in etwa mit dem Ausgangswert jener Frauen übereinstimmt, die normalgewichtige Kinder geboren hatten (Gruppe 1). Die hohen Werte bei den Frauen mit übergewichtigen Kindern (Gruppe 2) gehen vorwiegend zu Lasten des Anteils an gebundenem Insulin, der etwa 73% der gesamten ILA ausmacht; bei der Gruppe 1 beträgt er nur 65%. Wenn man die Insulinwerte mit den von RENOLD und STEINKE (26, 39, 41) ebenfalls am Fettgewebe ermittelten Werten vergleicht, dann ergeben sich überraschende Parallelen. Für Normalpersonen geben diese Autoren eine durchschnittliche Gesamt-ILA von 91 $\mu\text{E}/\text{ml}$ an; dieser Wert liegt für unsere Gruppe 1 mit 123 $\mu\text{E}/\text{ml}$ nur wenig höher, wobei zu bedenken ist, daß infolge des diabetogenen Effekts der eben durchgemachten Schwangerschaft selbst bei diesen gesunden Frauen eine gewisse vorübergehende Mehrproduktion von Insulin durchaus denkbar ist. Die Ausgangswerte der Gesamt-ILA der Gruppe 2 sind mit 189 μE praktisch identisch mit dem von RENOLD und STEINKE (26, 39, 41) angegebenen Durchschnittswert von 172 μE für ein Kollektiv von Prädiabetikern. Bei diesen Prädiabetikern handelte es sich um Personen einer bestimmten genetischen Konstellation - Kinder diabetischer Eltern bzw. nichtdiabetische Zwillingspartner eines bereits diabetischen ein-eiigen Zwillings - bei denen man berechtigt ist, vom Vorliegen eines Prädiabetes zu sprechen. Da man als weiteres Symptom des Prädiabetes neben frühen Veränderungen an den Gefäßen für die Mütter auch ein hohes Gewicht ihrer Neugeborenen ansieht, ergibt sich auf Grund unserer Ergebnisse eine interessante Korrelation: das Symptom "hohe Insulinspiegel" und das Symptom "hohes Neugeborenengewicht" fallen bei der Gruppe 2 der untersuchten Frauen zusammen und berechtigen mit hoher Wahrscheinlichkeit zu der Verdachtsdiagnose eines Prädiabetes. Diese Feststellung ist deswegen so besonders bemerkenswert, als der Unterschied im Neugeborenengewicht zwar deutlich ist, aber von einer exzessiven Übergewichtigkeit der Kinder in Gruppe 2 bei einem Durchschnittsgewicht von 4293 g kaum die Rede sein kann. Wie wichtig aber solche Abweichungen von dem Normalgewicht bereits sind, haben Untersuchungen von MEHNERT und KEMPE (38) gezeigt.

Diese Autoren stellten bei der Befragung von mehr als 600 Diabetikern bereits fest, daß diese Frauen vor der Manifestation des Diabetes Kinder geboren hatten, deren Geburtsgewicht zwar signifikant höher als das Gewicht der Kinder von Nichtdiabetikerinnen lag, aber mit etwa 3700 g keineswegs als außergewöhnlich hoch anzusehen ist. Umso eher sind wir berechtigt, einem Geburtsgewicht von mehr als 4000 g bei nichtdiabetischen Frauen doch bereits eine gewisse Aussagekraft im Hinblick auf einen Prädiabetes zuzubilligen.

Die erhöhten Seruminsulinwerte der Frauen mit übergewichtigen Kindern ließen sich wegen der kleinen Probandenzahl nicht statistisch sichern. Wir verzichteten auf eine Erweiterung des Kollektivs aus zwei Gründen: Einmal war es uns wichtiger, die Dynamik der Insulinsekretion nach Glucosebelastung bei solchen Frauen zu überprüfen. Zum anderen hatte DITSCHUNEIT (36) an einer wesentlich höheren Zahl ($n=107$) von Frauen mit übergewichtigen Kindern (Geburtsgewicht über 4500 g) eine signifikante Erhöhung der Seruminsulinspiegel festgestellt. Der Autor kommt dabei auf Durchschnittswerte von $342 \mu\text{E/ml}$ gegenüber einem relativ hohen Durchschnittswert von $217 \mu\text{E pro ml}$ bei seinen Stoffwechselgesunden ($n=90$). Eine Bestätigung dieses Befundes bringen auch unsere Werte, ohne daß eine erneute statistische Sicherung erforderlich war. Hingegen schien es uns wichtig zu sein festzustellen, wie sich die Seruminsulinwerte nach Glucosebelastung und im Hinblick auf den Anteil von freiem und gebundenem Insulin unterscheiden würden. Voruntersuchungen liegen hier von DITSCHUNEIT vor, der allerdings eine intravenöse Glucosebelastung ($0,3 \text{ g/kg Körpergewicht}$) über 30 Minuten durchführte, während wir der oralen Glucosebelastung mit 100 g über 2 Stunden den Vortzug gaben. Außerdem wurde von uns zwischen freiem und gebundenem Insulin unterschieden, während DITSCHUNEIT nur die Gesamtinsulinaktivität am Fettgewebe bestimmte. Das Resümee der DITSCHUNEIT'schen Untersuchungen ist darin zu sehen, daß bei der intravenösen Glucosebelastung bei höheren Ausgangsspiegeln der Insulinwerte ein etwas trägerer Anstieg des Seruminsulins erfolgt als bei den Stoffwechselgesunden. Bei zwei weiteren Versuchsgruppen dieses Autors nämlich bei Frauen mit Riesenkindern und familiärer Diabetesbelastung sowie bei offenbar genetisch definierten Prädiabetikern, wird dieses Verhalten noch ausgeprägter, d. h. die Seruminsulinspiegel sind vor der Glucosebelastung noch höher und das Ansprechen im Hinblick auf die Insulinsekretion ist dementsprechend geringer. Über ein solches Verhalten bei Prädiabetikern hatten RENOLD und STENKE (39, 41) bereits früher berichtet. Hier scheint ein gewisser Widerspruch zu unseren Ergebnissen zu bestehen, da die anfänglich überhöhten Werte der Gesamt-ILA der Gruppe 2 nach der Glucoseabgabe nicht nur bestehen blieben, sondern sogar noch erheblich zunahmen. Das von den genannten Autoren für ihre Prädiabetiker diskutierte Unvermögen des Pankreas, trotz noch erhaltener Glucosetoleranz genügend Insulin auszuschütten, läßt sich also an unseren Probandinnen nicht - oder noch nicht? - erkennen. Hierzu ist verschiedenes zu sagen: Auch

DITSCHUNEIT sah ja, wie geschildert, sozusagen eine allmähliche Steigerung des pathologischen Verhaltens innerhalb seiner Versuchsgruppen, wobei die unserer Gruppe 2 entsprechenden Frauen mit übergewichtigen Kindern ohne erbliche Diabetes mellitus-Belastung noch relativ gut auf die Glucosegabe ansprachen. Eine stärkere Insulinausschüttung als bei Stoffwechselgesunden beobachtete dieser Autor allerdings nicht. Dieser Unterschied läßt sich wohl am besten mit der unterschiedlichen Methodik der Glucosebelastung erklären. DITSCHUNEIT wie auch RENOLD und STEINKE zwangen durch die intravenöse Glucosebelastung den Inselapparat des Pankreas zu einer sofortigen Reaktion in Form einer starken Insulinausschüttung, deren Verhalten sie über 30 Min. prüften. Wir hingegen bestimmten die Blutzucker- und Seruminsulinspiegel über 2 Stunden nach einer oralen, d.h. relativ langsam in den Blutkreislauf gelangenden Gabe von Glucose. Unsere Frauen mit normalgewichtigen Kindern (Gruppe 1) reagierten darauf mit einem deutlichen, aber nicht pathologischen Blutzuckeranstieg, den sie durch eine geringfügig verstärkte, im peripheren Blut meßbare Insulinausschüttung auszugleichen vermochten. Bei unserer Gruppe 2 hingegen wurde zwar auch der Blutzuckeranstieg gut kompensiert, wobei sich aber der etwas verzögerte Abfall nach 120 Minuten als nicht signifikant erwies. Hierzu mußten aber wesentlich größere Mengen an Insulin mobilisiert werden, wie aus dem signifikanten Anstieg der Gesamtinsulinaktivität nach 60 und 120 Minuten und des freien Insulins nach 120 Minuten im Vergleich zu Gruppe 1 hervorgeht. Die verspätete Erhöhung des Spiegels an freiem Insulin im Vergleich zu Gruppe 1 (siehe Abb. 2) mag bereits auf eine gewisse Schwäche hinsichtlich der Insulinsekretion hinweisen, die den durch die Hyperglykämie gestellten Anforderungen nur mit Schwierigkeit gerecht werden kann. Der Unterschied hinsichtlich der Insulinausschüttung nach intravenöser und oraler Glucosegabe bei Frauen mit übergewichtigen Neugeborenen kann dadurch seine Erklärung finden, daß durch die noch intakte rasche Assimilation der Glucose innerhalb von 30 Minuten bei intravenöser Belastung nur vorübergehend eine verstärkte Ausschüttung von Seruminsulin erforderlich ist. Bei der quantitativ wesentlich höheren Glucosemenge bei oraler Belastung wird durch den Vorgang der verzögerten Magenentleerung und der Resorption über wesentlich längere Zeit 4 - 5 mal mehr Glucose angeboten. Auf diese Weise wird auch mehr und über längere Zeit Insulin benötigt, um eine normale Glucoseassimilation zu gewährleisten. Dabei ist es eben die Eigentümlichkeit der potentiell im Hinblick auf einen Diabetes gefährdeten Frauen mit übergewichtigen Kindern, daß sie zur Stoffwechselregulierung mehr Insulin benötigen als andere Personen. Vielleicht hängt dies mit der schlechten Ansprechbarkeit des Gewebes auf das Insulin unter dem Einfluß verschiedener Insulin-Antagonisten (Hormone, Serumerweiß, Fettsäuren) zusammen. Eine Bestätigung unserer Befunde liefert die Feststellung von STEINKE (39, 41), der bei genetisch definierten Pradiabetikern eine Stunde nach der Glucosegabe deutlich überhöhte Seruminsulinspiegel im Vergleich zu Gesunden fest-

stellte. Seine Ergebnisse sind: 364 $\mu\text{E/ml}$ bei Gesunden, 688 $\mu\text{E/ml}$ bei Prädiabetikern und 660 bzw. 784 $\mu\text{E/ml}$ bei Diabetikern. Ähnliches berichteten auch YALOW und BERSON (43) bei fettsüchtigen Diabetikern. Da GRODSKY und Mitarbeiter (40) diesen Befund bei ebenfalls genetisch definierten Prädiabetikern ohne Übergewicht nicht bestätigen konnten, werfen sie die Frage auf, ob nicht die gesteigerte HLA bei Fettsüchtigen allein für die hohen Werte verantwortlich ist. Diese Erklärung trifft allerdings bei unseren Wöchnerinnen nicht zu.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß bei den von uns untersuchten Wöchnerinnen, die wenige Tage zuvor von einem Kind mit hohem Geburtsgewicht entbunden worden waren, als weiteres prädiabetisches Symptom ein abnormes Verhalten der Seruminsulinwerte vor und nach Glucosebelastung festgestellt wurde. Von besonderem Interesse wäre eine Nachuntersuchung dieser Frauen nach einigen Monaten, um zu erkennen, ob dieses prädiabetische Verhalten der Seruminsulinspiegel in solchen Fällen nur unmittelbar nach der Belastung des Organismus durch die Gravidität faßbar ist.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Bei 24 Frauen, bei denen wenige Tage vorher eine Entbindung stattgefunden hatte, wurden Bestimmungen der Blutglucose und Seruminsulinwerte nach oraler Glucosebelastung vorgenommen. In methodischer Hinsicht erwies sich, daß die Insulinbestimmung am Diaphragma der Ratte sehr ungenau und dem Test am Nebenhodenfettgewebe unterlegen ist. Es konnte unterschieden werden zwischen den am Nebenhodenfettgewebe gemessenen Werten der gesamten "insulinähnlichen Aktivität" (höchste Werte) und dem Anteil des mit Antiserum unterdrückbaren sog. freien Insulins (niedrigste Werte). Die Werte des sog. freien Insulins, die am Diaphragma bestimmt wurden, liegen wesentlich höher als die mit der Antiserummethode ermittelten Ergebnisse, wenn auch etwas niedriger als die gesamte "insulinähnliche Aktivität" am Fettgewebe. Parallel zum Blutglucoseanstieg nach oraler Traubenzuckerbelastung zeigten die untersuchten Wöchnerinnen einen charakteristischen Anstieg der Seruminsulinwerte. Dabei ergab sich, daß diejenigen Frauen, die wenige Tage zuvor von einem Kind mit hohem Geburtsgewicht entbunden worden waren, als weiteres prädiabetisches Symptom ein abnormes Verhalten der Seruminsulinwerte vor und nach Glucosebelastung zeigten. Bei diesen Probandinnen konnte ein signifikanter Anstieg der gesamten Insulinaktivität 60 und 120 Minuten und des freien Insulins 120 Minuten nach der Glucosebelastung im Vergleich zu den Frauen mit normalgewichtigen Neugeborenen festgestellt werden. Die verspätete Erhöhung des Spiegels an freiem Insulin mag bereits auf eine Schwäche der Insulinsekretion hindeuten, die den durch die Hyperglykämie gestellten Anforderungen nur mit Schwierigkeit gerecht werden kann. Die Ergebnisse wurden an Hand des vorliegenden Schrifttums diskutiert.

Herrn Professor Dr. W. Seitz (Direktor der Med. Universitäts-Poliklinik) und Herrn Professor Dr. W. Lamprecht (Direktor des Biochemischen Institutes der Technischen Hochschule in München-Pasing) danke ich für die Möglichkeit, die experimentellen Untersuchungen durchführen zu können. Herrn Professor Dr. R. Fikentscher (Direktor der II. Universitäts-Frauenklinik) danke ich für die Überlassung des Patientengutes.

Herrn Priv.-Dozent Dr. H. Mehnert (Med. Universitäts-Poliklinik) und Herrn Dr. F.W. Dittmar (II. Universitäts-Frauenklinik) danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Groen, J.
Kamminga, C.E.
Willebrands, A.F.
Blickman, J.R. Evidence of the presence of insulin in blood serum. A method for an approximate determination of the insulin content of blood. *J. clin. Invest.* 1952, 31, 97
2. Willebrands, A.F.
Groen, J. Determination of serum insulin by rat diaphragm method; further observations in diabetic and nondiabetic subjects and in hyperinsulinism.
Diabetes 1956, 5, 378
3. Willebrands, A.F.
Geld v. d., H.
Groen, J. Determination of serum insulin using the isolated rat diaphragm. The effect of serum dilution.
Diabetes 1958, 7, 119
4. Vallance-Owen, J.
Hurlock, B. Estimation of plasma-insulin by the rat diaphragm method.
Lancet 1954, 1, 68
5. Vallance-Owen, J.
Hurlock, B.
Please, N. Plasma-insulin activity in diabetes mellitus, measured by the rat diaphragm technique.
Lancet 1955, 2, 583
6. Randle, P.J. Assay of plasma insulin activity by the rat diaphragm method.
Brit. med. J. 1954, 1232
7. Randle, P.J. Insulin in blood.
Ciba Found. Colloq. Endocrin. 1957, 11, 115
8. Wright, P.H. Plasma insulin estimation by the rat diaphragm method.
Lancet 1957, 2, 621
9. Stadie, W.C.
Zapp, J.A. The effect of insulin on the synthesis of glycogen by rat diaphragm in vitro.
J. biol. chem. 1947, 170, 55

10. Kozan, M.E.
Park, C.R.
The uptake of glucose by the isolated diaphragm of normal and hypophysectomized rats.
J. biol. chem. 1948, 174, 939
11. Bleeher, N.M.
Fisher, R.B.
The action of insulin in the isolated rat heart.
J. Physiol. (London) 1954, 123, 260
12. Blamain, J.H.
Cox, C.P.
Folley, S.J.
McNaught, M.L.
The bioassay of insulin in vitro by manometric measurement on slices of mammary glands.
J. Endocr. 1954, 11, 269
13. Humbel, R.E.
Messung der Serum-Insulinaktivität mit epididymalem Rattenfettgewebe in vitro
Experientia (Basel) 1959, 15, 256
14. Staub, M.
Biol. Bestimmungsmethoden für Insulin mit Zwerchfell und epididymalem Fettgewebe der Ratte in vitro.
Schweiz. med. Wschr. 1958, 88, 831
15. Humbel, R.E.
Staub, M.
Froesch, R.E.
Der Einfluß von Insulin und oralen Antidiabetica auf die Glucoseaufnahme und den Gasaustausch vom isolierten Fettgewebe.
Schweiz. med. Wschr. 1959, 14, 381
16. Beigelman, P.M.
Insulin-like-activity of normal and diabetic human serum.
Diabetes 1959, 8, 29
17. Steelman, S.L.
Oslapas, R.
Busch, R.D.
An improved in vitro method for determination of serum "insulin-like" activity.
Proc. Soc. exp. Biol. 1960, 105, 595
18. Ball, E.G.
Merill, M.A.
A manometric assay of insulin and some results of the application of the method to sera and islet-containing tissues.
Endocrinology 1961, 69, 596
19. Martin, D.B.
Renold, A.R.
Dagenais, Y.M.
An assay for insulin-like-activity using rat adipose tissue.
Lancet 1958, II, 76

20. Winegard, A.T.
Renold, A.E.
Studies of the rat adipose tissue in vitro.
1. Effects of insulin on the metabolism of glucose, pyruvate and acetate.
2. Effects of insulin on the metabolism of specifically labeled glucose.
J. biol. Chemie 1958, 233, 267
21. Hausberger, F.X.
Milstein, S.W.
Rutman, R.J.
The influence of insulin on glucose utilization in adipose and hepatic tissues in vitro.
J. biol. Chem. 1954, 208, 431
22. Milstein, S.W.
Oxydation of specifically labeled glucose by rat adipose tissue.
Proc. Soc. exp. Biol. 1956, 92, 632
23. Ditschuneit, H.
Chang-Su Ahn
Pfeiffer, M.
Pfeiffer, E.F.
Über die Bestimmung von Insulin im Blut am epididymalen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glucose.
Klin. Wschr. 1959, 37, 1234-1239
24. Weinges, K.F.
Wörner, H.
Über den Einfluß von Insulin und Glukagon auf den Glucosestoffwechsel des epididymalen Fettanhangs der Ratte.
Der Einfluß von Insulin und die sich daraus ergebende Möglichkeit zur Bestimmung einer insulinähnlichen Aktivität im menschlichen Blut.
Klin. Wschr. 1961, 39, 238
25. Abraham, S.
Cady, P.
Chaikoff, J.L.
Effect of insulin in vitro on pathway of glucose utilization, other than Embden-Mayerhof, in rat mammary gland.
J. biol. Chem. 1957, 224, 955
26. Renold, A.E.
Martin, D.B.
Dagenais, Y.M.
Steinke, J.
Nickerson, R.J.
Sheps, M.C.
Measurement of small quantities of insulin-like activity using rat adipose tissue.
1. A proposed procedure
2. Evaluation of performance
J. clin. Invest. 1960, 39, 1487
27. Katz, J.
Abraham, S.
Hill, R.
Chaikoff, J.L.
The occurrence and mechanism of the hexose monophosphate shunt in rat liver slices.
J. biol. Chem. 1955, 214, 853

28. Cahill, G.F.
Leboeuf, B.
Renold, A.E. Studies on rat adipose tissue in vitro.
J. biol. Chem. 1959, 234, 2540
29. Ditschuneit, H.
Pfeiffer, E.F.
Faulhaber, J.D. Verbesserung der Methode zur Bestimmung
von Insulin im Blut mit Hilfe radioaktiver
1-¹⁴C-Glucose und dem epididymalen
Rattenfettgewebe.
Atompraxis 1962, 8, 172
30. Froesch, E.R.
Bürgi, H.
Bally, P.
Ramseier, E.B.
Labhart, A. Antibody suppressible and nonsuppressible
insulin-like activity in human serum and
their physiologic significance. An insulin
assay with adipose tissue of increased
precision and specificity.
J. of clin. Invest. 1963, 42, 1816
31. Milstein, S.W.
Hausberger, F.X. Lipogenesis and carbohydrate utilization;
effects of the glucose concentration and
insulin in rat liver and adipose tissue.
Diabetes 1956, 5, 89
32. Hausberger, F.X.
Milstein, S.W. Dietary effects of lipogenesis in adipose
tissue.
J. biol. Chem. 1955, 214, 483
33. Antoniades, H.N.
Beigelman, P.M.
Tranquada, R.P.
Gunderson, K. Studies on the state of insulin in blood;
"Free" insulin and insulin complexes in
human sera and their in vitro biological
properties.
Endocrinology 1961, 69, 46
34. Worm, M. Diabetes mellitus und Schwangerschaft,
Akademie-Verlag Berlin, 1959
35. Mestwerdt, G. Exogene Ursachen des intrauterinen Frucht-
todes und ihre Vermeidung.
Arch. Gynäkol. 1957, 189, 44
36. Ditschuneit, H. Antrittsvorlesung Wintersemester 1964/65
Deutsche med. Wschr. im Druck
37. Constam, G.R.
Jost, L.
Rust, Th.
Willi, H. Diabetes und Schwangerschaft
Schweiz. med. Wschr. 1963, 93, 1611

LEBENS LAUF

Am 23. Februar 1940 wurde ich, Dietmar Ennemoser, als Sohn des prakt. Arztes Dr. med. Sepp Ennemoser und seiner Ehefrau Senta, geb. Ostertag, in Nürnberg geboren. In Weiler im Allgäu besuchte ich ab 1946 die Volksschule, ab 1950 die Oberrealschule in Lindenberg im Allgäu. In München besuchte ich ab 1954 die Gisela-Oberrealschule und beendete die Schulzeit 1960 mit der Reifeprüfung. Im Wintersemester 1960/61 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität München, legte zwei Semester später das Vorphysikum ab und bestand im Wintersemester 1962/63 das Physikum. Seit Dezember 1964 bin ich mit Christiane Ennemoser, geb. Fabricius, verheiratet.

Ich beabsichtige, im Wintersemester 1965/66 das Medizinstudium mit dem Staatsexamen abzuschließen.

